

金属离子对苏云金芽孢杆菌几丁质酶活力的影响<sup>\*</sup>黄小红<sup>1</sup> 许雷<sup>2</sup> 陈清西<sup>3</sup> 王君<sup>3</sup> 沙莉<sup>1</sup> 关雄<sup>1\*\*</sup>

(1. 福建农林大学动物科学学院生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081;

3. 厦门大学生命科学学院教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 厦门 361005)

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 几丁质酶; 酶活力; 金属离子

Effects of Metal Ions on the Chitinase Activity from *Bacillus thuringiensis*HUANG Xiaohong<sup>1</sup> XU Lei<sup>2</sup> CHEN Qingxi<sup>3</sup> WANG Jun<sup>3</sup> SHA Li<sup>1</sup> GUAN Xiong<sup>1\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; chitinase; enzyme activity; metal ions

几丁质酶 (EC 3.2.1.14) 是细菌、病毒、真菌等微生物、高等植物和昆虫体内普遍合成的一种具有生物催化活性的水解酶类。它能特异地催化水解几丁质的  $\beta$ -1,4-糖苷键生成 N-乙酰-D-氨基葡萄糖 (NAG)。几丁质酶因为具有水解几丁质破坏围食膜的作用而被作为防治真菌病害和害虫的潜在靶标 (蒋红彬等, 2000; 沙莉等, 2003)。几丁质酶能增强苏云金芽孢杆菌 (Bt) 的杀虫效果, 有利于克服或延缓昆虫对 Bt 的抗性。

本实验应用细粉几丁质诱导培养出批量的 Bt, 从菌液中分离提取 Bt 几丁质酶, 研究不同浓度金属离子对其酶活力的影响。旨在揭示 Bt 几丁质酶的活力调控情况, 以期几丁质酶作为靶标的新型生物杀虫剂的开发利用提供理论指导。

## 1 材料和方法

## 1.1 材料

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) W B7 (Bt) 为福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室自行分离和保藏的菌株。细粉几丁质为上海微纳科技有限公司的产品; 胶体几丁质制备参照李力等 (2000) 的方法; DEAE-32 系 Pharmacia 产品; 其它试剂均为国产分析纯。

## 1.2 方法

将 Bt 接种于 LB 培养基中, 30 °C 活化 12 h, 后转接到 pH 7.2 产酶培养基 (含 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.2%  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 、0.05%

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05%  $\text{KCl}$ 、2.0% 细粉几丁质和 1.0% 酵母膏) 中, 30 °C 恒温下, 175 r/min 往复式摇床振荡 72 h, 收集发酵液。离心去除菌体, 取上清液, 用 35% ~ 70% 硫酸铵分级分离和 DEAE-纤维素 (DE-32) 离子交换柱层析纯化, 获得 Bt 几丁质酶制剂。酶活力的测定以 10% 胶体几丁质为底物, 在 0.5 mL 的测活体系中 (含终浓度为 0.1 mol/L  $\text{NaAc-HAc}$  缓冲液 (pH 5.6), 0.25% 胶体几丁质), 于 42 °C 恒温水浴中加入 20  $\mu\text{L}$  酶液, 准确反应 15 min, 加入 0.5 mL  $\text{NaOH}$  0.5 mol/L 终止反应。离心, 取上清液 0.5 mL, 加入 0.5 mL DNS 试剂, 沸水浴中煮沸 5 min, 在 Beckman DU-650 分光光度计测定  $OD_{520}$  值。以 N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 为产物对照。

## 2 结果和分析

## 2.1 正二价碱土金属离子对酶的效应

$\text{LiSO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaCl}$  和  $\text{NaNO}_3$  等对 Bt 几丁质酶活力没有任何影响。说明一价金属离子和  $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$  和  $\text{NO}_3^-$  等酸根离子对酶活力没有效应。以  $\text{MgCl}_2$  和  $\text{CaCl}_2$  为效应物, 鉴定  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对酶活力的影响。结果 (图 1) 表明,  $\text{Mg}^{2+}$  对 Bt 几丁质酶有一定的激活作用, 在浓度低于 2 mmol/L 激活作用明显, 可使酶活力提高 33%; 浓度 2~6 mmol/L,  $\text{Mg}^{2+}$  的激活作用维持在恒定水平。 $\text{Ca}^{2+}$  对酶的效应表现为抑制作用, 随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增大, 对酶的抑制逐渐加强, 当浓度为 6 mmol/L

\*基金项目: 国家高技术研究与发展计划 (863) 项目 (No. 2002AA245011) 和福建省重大科技计划项目 (No. 2002N004) 资助。

黄小红: 女, 1966 年生, 博士研究生, 副教授。

\*\* 通讯作者: Author for correspondence. E-mail: &lt;gx@fjau.edu.cn&gt;.

收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-06-10

时,酶活力下降 30%。

### 2.2 正三价金属离子对酶的效应

用  $FeCl_3$  作效应物,在 0~16 mmol/L 范围内研究正三价金属离子  $Fe^{3+}$  对酶活力的影响。实验结果 (图 1)表明, $Fe^{3+}$  对酶活力有抑制作用,在 12 mmol/L 时, $Fe^{3+}$  使几丁质酶活力下降 54.6%。

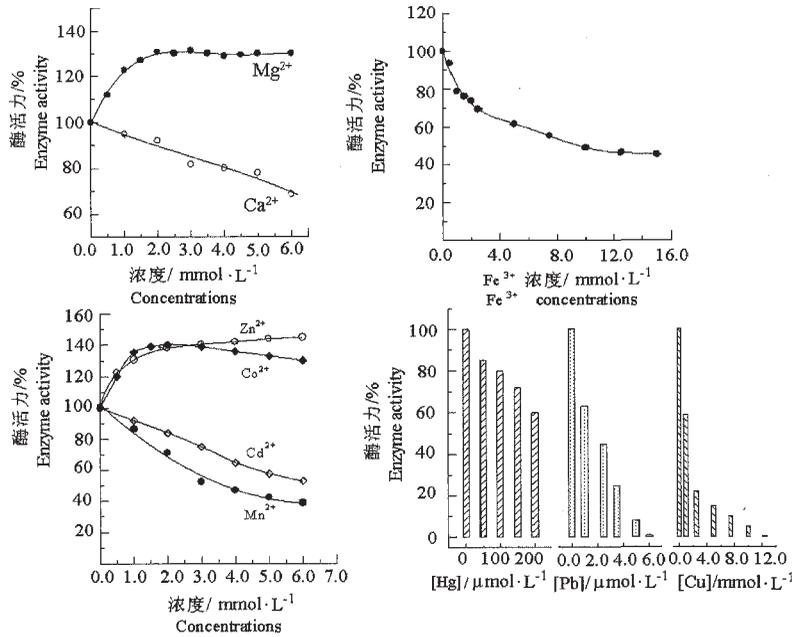


图 1.金属离子对 Bt 几丁质酶活力的影响

Fig. 1. Effects of metal ions on the chitinase enzyme activity

### 2.3 过渡金属离子对酶活力的影响

以  $MnSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、 $CdCl_2$  和  $CoCl_2$  等无机盐为效应物,研究过渡金属离子  $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  对酶活力的影响。实验结果 (图 1)表明, $Zn^{2+}$  和  $Co^{2+}$  对该酶有不同程度的激活作用。激活趋势有所不同, $Co^{2+}$  的激活作用先达到最大值,然后缓慢下降; $Zn^{2+}$  的激活则表现缓慢地加强。而  $Mn^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  对酶表现为抑制作用, $Mn^{2+}$  对酶的抑制作用强于  $Cd^{2+}$ , 当浓度达到 6 mmol/L 时,酶活力分别降低 60.1%和 46.0%。

### 2.4 重金属离子对酶活力的影响

选择  $HgCl_2$ 、 $Pb(NO_3)_2$  和  $CuSO_4$  为效应物,研究  $Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  等重金属离子对酶活力的影响。结果 (图 1)表明, $Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  对 Bt 几丁质酶的活性均有抑制作用。其中  $Pb^{2+}$  的抑制作用最强,浓度只要 6.0 mmol/L 就可以使酶活力完全丧失。 $Cu^{2+}$  浓度需要高达 12 mmol/L 才能使酶活力完全丧失,导致酶活力完全丧失需要  $Cu^{2+}$  浓度是  $Pb^{2+}$  浓度的 20 倍。 $Hg^{2+}$  对酶活力也有明显的抑制作用,当  $Hg^{2+}$  浓度为 200 mmol/L 时,可以使酶活力下降 42%。

### 3 讨论

正一价金属离子对 Bt 几丁质酶没有影响。碱金属离子在细胞内外都是常见的,细胞对这些离子浓度的变化有着严密的调控机制,通过长期的进化,酶的结构与功能已适应这些离子浓度的变化 (Chen *et al.*, 2000)。正二价碱土金属离子中  $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  是许多酶的激活因子,但对几丁质酶,不同来源的酶其影响不同。 $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  对淡紫拟青霉和黄蓝状菌几丁质酶有激活作用;而  $Mg^{2+}$  对豇豆几丁质酶则起抑制作用。本实验结果表明, $Mg^{2+}$  对 Bt 几丁质酶有激活作用,而  $Ca^{2+}$  对此酶则有一定的抑制作用。正三价金属离子对酶影响的研究报道相对较少,本实验用  $FeCl_3$  为效应物,研究了  $Fe^{3+}$  对几丁质酶活力的影响,表明  $Fe^{3+}$  对酶活力有一定的抑制作用,此结果与链霉菌 S01 菌株几丁质酶 (杨文博等, 1997) 所得到的结果一致。在研究过渡金属离子对 Bt 几丁质酶的作用时发现,  $Zn^{2+}$  和  $Co^{2+}$  对几丁质酶有激活作用;  $Cd^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  对酶有不同程度的抑制作用。在相同的金属离子浓度下,  $Mn^{2+}$  的抑制能力强,  $Cd^{2+}$  的抑制能力较弱。重金属离子对酶一般都有抑制作用,它们常常可以使酶变性而失活,尤其是  $Pb^{2+}$  和  $Hg^{2+}$  对酶具有很强的抑制能力,本实验也得到类似的结果。 $Hg^{2+}$  对来自豇豆和罗氏沼虾肝胰腺几丁质酶同样具有很强的抑制作用 (杨文博等, 1997)。

### 参 考 文 献

Jiang H B (蒋红彬), Zhang Y (张瀛) and Jiang Q L (蒋千里). Advances in the research of chitinase. *Shandong Science* (山东科学), 2000, 13 (4): 41~45

Sha L (沙莉), Su Z X (苏争先), Huang X H (黄小红), Qiu J Z (邱君志) and Guan X (关雄). Microorganism chitinases Molecular biology and potential use of biopesticides. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2003, 11: 642~647 (in Chinese with English abstract)

Li L (李力), Huang S Y (黄胜元) and Guan X (关雄). Screening of *Bacillus thuringiensis* strains producing chitinase and study on its synthetic conditions. *Virologica Sinica* (中国病毒学), 2000, 15: 94~97 (in Chinese with English abstract)

Chen Q X, Zheng W Z, Lin J Y, *et al.* Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla senata*) alkaline phosphatase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2000, 32: 879~885

Yang W B (杨文博), Feng B (冯波) and Tong S M (佟树敏). Steptomyces SP S01. *Microbiology Bulletin* (微生物学通报), 1997, 24 (2): 84~88 (in Chinese)